

STRESZCZENIE

Uszkodzenie rdzenia kręgowego prowadzi do przerwania i degeneracji dróg nerwowych, które mają swoje źródło w ośrodkach nadrdzeniowych. W rezultacie pacjent doświadcza częściowej lub całkowitej utraty zdolności ruchowej, której stopień zależy od lokalizacji i stopnia uszkodzenia rdzenia. Takie urazy często wiążą się z trwałą niepełnosprawnością, gdyż obecne metody leczenia są ograniczone w swojej skuteczności. Jedną z obiecujących strategii jest wzbogacanie sieci neuronowej poniżej miejsca uszkodzenia w neurotrofiny – niskocząsteczkowe białka promujące przeżycie neuronów i procesy plastyczności synaptycznej.

W niniejszej dysertacji dorosłym szczurom po całkowitym przecięciu rdzenia kręgowego (SCT) na poziomie dolnych segmentów piersiowych podano dordzeniowo wektor AAV niosący gen czynnika neurotroficznego pochodzenia mózgowego (AAV-BDNF). Zwierzęta z nadekspresją BDNF wykazały szybką i znaczącą poprawę sprawności ruchowej; w trzecim tygodniu po uszkodzeniu odzyskały zdolność do naprzemiennego ruchu kończyn, podporu masy ciała i stawiania stóp na podszewie w trakcie treningu na ruchomym bieżniku. Te wyniki, uzyskane w grupie 14 zwierząt stały się mocnym potwierdzeniem potencjału terapeutycznego wektora AAV-BDNF zaobserwowanego wcześniej w eksperymencie chronicznym przeprowadzonym w naszym Zespole. W doświadczeniu trwającym 6 tygodni okres najlepszej poprawy funkcjonalnej przypadał na trzeci tydzień po SCT i iniekcji AAV-BDNF, zaś w późniejszych czasach pooperacyjnych pojawiały się efekty uboczne w postaci drgawek i ruchów klonicznych, najprawdopodobniej związane z nadmierną stymulacją sieci.

W niniejszej pracy postanowiono odpowiedzieć na pytanie o molekularne podłoże terapeutycznego działania BDNF. W tym celu scharakteryzowano zmiany neurochemiczne i strukturalne w rdzeniu kręgowym i złączy nerwowo-mięśniowym w okresie największej poprawy funkcjonalnej. Ze względu na przesłanki wskazujące na różną wrażliwość na SCT obwodów neuronalnych dwóch przeciwstawnie działających mięśni stawu skokowego: zginacza (Tibialis anterior, TA) i prostownika (Soleus, Sol), zbadano motoneurony i złącza nerwowo-mięśniowe tych dwóch mięśni. Połączenie analizy komórkowej i subkomórkowej dystrybucji mRNA, ocenianej na podstawie fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ oraz analizy rozmieszczenia białek wykrywanych za pomocą immunofluorescencji na skrawkach tkanki umożliwiło kompleksową odpowiedź na pytania o wpływ uszkodzenia i nadekspresji BDNF na odpowiedzi komórkowe w rdzeniu kręgowym i mięśniach. W celu zbadania zmian w ultrastrukturze złącza nerwowo-mięśniowego posłużono się transmisyjną mikroskopią elektronową.

Wykazano, że w trzecim tygodniu po podaniu wektora nadekspresja BDNF w rdzeniu kręgowym koncentrowała się w neuronach segmentów lędźwiowych L1-L2, bliskich miejsca iniekcji, natomiast w rejonie motoneuronów tylnych kończyn, zlokalizowanych w segmentach L3-L6, białko transgeniczne obserwowano tylko we włóknach transdukowanych komórek. Na podstawie tak scharakteryzowanego rozmieszczenia rekombinowanego BDNF wysunięto wniosek, że lokalnie wprowadzony wektor prowadzi do działania transgenicznego białka na neurony zlokalizowane w przestrzeni całego odcinka lędźwiowego. Dowiedziono, że terapia wywarła szereg pozytywnych skutków: pozwoliła utrzymać obniżoną po SCT receptywność motoneuronów na BDNF wpływając na ekspresję receptora o wysokim powinowactwie TrkB, spowodowała zwiększoną aktywność transkrypcyjną podłączowych jąder komórkowych miocytów i przyczyniła się do normalizacji markerów przekąźnictwa neuronalnego w mięśniu. Ponadto stwierdzono, że iniekcja AAV-BDNF doprowadziła do zachowania integralności strukturalnej złączy nerwowo-mięśniowych, przy czym jednostka nerwowo-mięśniowa Soleusa odpowiadała lepiej na terapię. Uzyskane wyniki przyczyniają się do zrozumienia mechanizmu działania neurotrofiny BDNF oraz wskazują na potencjalnie użyteczny kierunek badań: terapię celowaną przeznaczoną do wybranych typów jednostek motorycznych.

ABSTRACT

Spinal cord injury leads to the disruption and degeneration of neural pathways originating in supraspinal centers. Consequently, patients experience partial or complete loss of motor function, the extent of which depends on the location and severity of spinal damage. Such injuries often result in permanent disability due to limited effectiveness of current treatment methods. One promising strategy involves enriching the neuronal network below the injury site with neurotrophins – low molecular weight proteins that promote neuron survival and synaptic plasticity processes.

In this dissertation, adult rats subjected to complete spinal cord transection (SCT) at the lower thoracic segments were administered an intraspinal AAV vector carrying the brain-derived neurotrophic factor gene (AAV-BDNF). Animals overexpressing BDNF demonstrated rapid and significant improvement in motor function; by the third week post-injury, they regained the ability for alternating limb movements, weight-bearing, and plantar stepping during treadmill training. These results, obtained in a group of 14 animals, strongly confirmed the therapeutic potential of the AAV-BDNF vector previously observed in a chronic experiment conducted by our Team. In the 6-week experiment, the best functional improvement occurred in the third week post-SCT and AAV-BDNF injection, but side effects in the form of clonic movements emerged in later postoperative periods, likely related to overstimulation of the network.

This study aimed to elucidate the molecular basis of BDNF's therapeutic action. To this end, neurochemical and structural changes in the spinal cord and neuromuscular junction were characterized during the period of greatest functional improvement. Given indications of different SCT sensitivities in the neuronal circuits of two antagonistic muscles of the ankle joint: the flexor (Tibialis anterior, TA) and extensor (Soleus, Sol), motoneurons and neuromuscular junctions of these two muscles were examined. Combining cellular and subcellular mRNA distribution analysis, assessed via fluorescent in situ hybridization, and protein distribution analysis using immunofluorescence in tissue sections, provided a comprehensive response to questions about the impact of injury and BDNF overexpression on cellular responses in the spinal cord and muscles. Transmission electron microscopy was employed to examine changes in the ultrastructure of the neuromuscular junction.

It was demonstrated that, in the third week post-vector administration, BDNF overexpression in the spinal cord concentrated in neurons of the L1-L2 lumbar segments, close to the injection site, while in the area of the hind limb motoneurons, located in the L3-L6 segments, the transgenic protein was observed only in fibers of transduced cells. Based on this characterized distribution of recombinant BDNF, it was concluded that locally introduced vector leads to the transgenic protein's action on neurons located throughout the entire lumbar segment. The therapy was proven to have several positive effects: it maintained reduced SCT post-injury receptivity of motoneurons to BDNF, caused increased transcriptional activity of subsynaptic myocyte nuclei, and contributed to the normalization of neuronal signaling markers in the muscle. Moreover, AAV-BDNF injection preserved the structural integrity of neuromuscular junctions, with the Soleus motor unit responding more favorably to therapy. These results contribute to understanding the mechanism of action of the neurotrophin BDNF and point to a potentially useful research direction: targeted therapy for selected types of motor units.